

„RELAXATION“ DER KATALASE IN HEFEZELLEN

von

V. FRENYÓ und GY. PÁDI

Pflanzenphysiologischer Lehrstuhl der Eötvös Loránd Universität, Budapest

Eingegangen: 3. Dezember 1971

In unseren früheren Arbeiten (Frenyó – Pádi 1971) wurde die Katalaseaktivität der Hefezellen untersucht und beobachtet, daß die von der Wasserstoffhyperoxydlösung verursachte Inaktivierung nicht endgültig ist, sondern die Katalaseaktivität sich nach einer gewissen Zeit wiederholterweise erneuert. Diese Erscheinung ist theoretisch und praktisch genommen gleichfalls beachtenswert. Es ist uns bewußt, daß die Katalase ihrem eigenen Substrat, also dem Hyperoxyd gegenüber empfindlich ist, was die Wirksamkeit des Enzyms herabsetzt. Wie ist es also möglich, daß sich die Aktivität wiederherstellt? Die praktische Seite der Frage hängt mit der Lebensmittelkontrolle zusammen, da wir mit der Katalaseuntersuchung die Infiziertheit bzw. das Vorhandensein solcher Mikroorganismen festzustellen wünschen, die Katalase enthalten (Frenyó – Herczegh – Pádi 1970).

Das sind jene Gesichtspunkte, die die folgenden Untersuchungen, im Laufe deren wir auch die diesbezügliche Forschungstätigkeit anderer Autoren (Mihályfi 1965; Sábel et al. 1963) in Betracht gezogen hatten, begründeten.

Methodologischer Teil

Zum Zweck der Untersuchung haben wir das auf der Abb. 1. vorgeführte Gerät konstruiert. Im wesentlichen ist es ein Kugelskolben von 50–100 ml (1), in dessen geschliffener Öffnung sich eine Meßkapillare fügt (2). In den Kolben führen wir eine Hefesuspension und 1%ige H_2O_2 -Lösung ein. Da die Kapillare bis zum Boden des Kolbens reicht, kann sich das entwickelte Gas nicht entfernen, sondern verdrängt einen Teil der Flüssigkeit aus dem Gefäß. Die Höhe der in die Kapillare eindringenden Flüssigkeitssäule bezeichnet, was für ein Volumen das entstandene Gas einnimmt. Das Gas wird durch die Katalasetätigkeit der Hefezellen nach dem folgenden Prozeß erzeugt:



Mit Hilfe der in den Kolben untergebrachten Glaskugeln kann die Flüssigkeit gerührt werden. Der Glasstöpsel in der Öffnung, an der Seite des Kolbens, kann wie ein Zapfen verdreht (3) und auf diese Weise die Flüssigkeitssäule aus der Meßkapillare wiederholterweise abgelassen werden. Die Messung läßt sich also nach Belieben durch Verschluß des Zapfens wiederholen.

Der hohle Kugel am oberen Teil der Meßkapillare dient zur Verhinderung des Überlaufes.

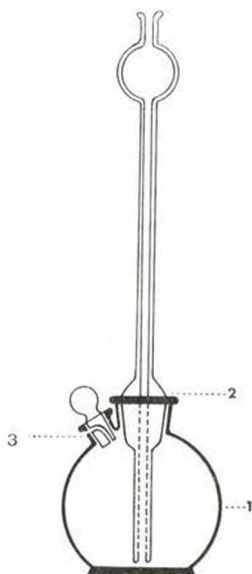


Abb. 1. Meßgerät zur Katalasenuntersuchung 1 = der zur Aufnahme der Hefesuspension und der 1%igen H_2O_2 -Lösung dienende Kolben; 2 = kalibrierte Meßkapillare; 3 = mit Öffnung versehener Abschlußstöpsel. (Erklärung im Text)

Die Versuchsserie wurde so durchgeführt, daß wir 0,1 g frische Bäckerhefe in 100 ml-Leitungswasser suspendiert und daraus eine Verdünnungsserie bereitet haben. Mit Hilfe einer Bürkerschen Kammer wurde jene Suspension ausgesucht, die Hefezellen von 2×10^6 /ml enthielt. Damit wurde bis zur Hälfte das auf der Abb. 1 sichtbare Meßgefäß gefüllt, sodann die das noch übrige Volumen mit 2%iger H_2O_2 -Lösung aufgefüllt. Bei der Gemischbildung kam im Meßgefäß eine 10^6 /ml-Zellensuspension und 1%ige H_2O_2 -Lösung zustande.

Ergebnisse: Diskussion

Die Katalaseaktivität bezeichnenden Werte erhielten wir in der Weise, daß nach der Füllung des Meßgefäßes und dem Einsetzen der Meßkapillare der Zapfen der Seitenöffnung verschlossen wurde. Durch ständige Bewegung des Gefäßes haben die Glaskugeln die Flüssigkeit gerührt, so daß sich die Hefezellen nicht setzen konnten. Es wurde gemessen, wieviel Zeit benötigt wird, um so viel O_2 -Gas zu entwickeln, daß

sich die Meßkapillare mit Flüssigkeit füllt. Nachträglich wurde das Ergebnis auf Zeiteinheiten umgerechnet und das zu diesen gehörende Volumen errechnet. Mit Drehen des Zapfens wurde die Messung nacheinander 14mal wiederholt, wobei sich zuerst stürmisch, dann in einem sich stets verlangsamenden Tempo die frei werdende O_2 -Menge verminderte. Diese Meßserie wurde in der I. Spalte der Tabelle angeführt. Nachher ließen wir das Gerät mit der Flüssigkeit darin, mit geöffnetem Zapfen eine halbe Stunde lang „ruhen“, dann wurde dem vorangehenden Verfahren in ähnlicher Weise mit der II. Meßserie begonnen, im Laufe der wir die Aktivität 14mal aufeinanderfolgend maßen. Nach einer ebenfalls halbstündigen Pause folgte die III. Serie. Mit derselben Flüssigkeit haben wir nach einer langen Rastzeit von 24 Stunden unsere Messungen mit der IV. Meßserie fortgesetzt. Es konnten nur mehr 8 Messungen vorgenommen werden.

Die Zuverlässigkeit der Daten der beigelegten Tabelle macht der regelrechte Verlauf der Kurven der Abb. 2 wahrscheinlich.

Tabelle I.

Zeitliche Veränderung der Katalasetätigkeit der
Hefesuspension in 1%iger H_2O_2 -Lösung

Nr.	Ergebnisse der aufeinanderfolgenden Messungen ($\mu l O_2/min$)			
	I.	II.	III.	IV.
1.	825	1005	825	690
2.	450	1002	820	225
3.	306	825	546	66
4.	251	450	360	20
5.	209	225	195	16
6.	195	135	75	10
7.	183	90	49	9
8.	179	70	42	8
9.	173	55	40	—
10.	170	45	39	—
11.	167	42	37	—
12.	166	40	35	—
13.	165	38	34	—
14.	164	36	33	—

Die auf der Abb. 2 sichtbaren Kurven scheinen von logarithmischem Charakter zu sein, in Wirklichkeit können sie jedoch mathematisch schwer charakterisiert werden. Dies weist darauf hin, daß eine jede Kurve die Kombination von mehreren Funktionen ist. Außer den Änderungen der Wirksamkeit des Enzyms verändert sich zufolge des Abbaues durch

Enzym auch die Konzentration des Substrats. Vielleicht beeinflußt den Verlauf der Kurven auch die Diffusionsgeschwindigkeit der H_2O_2 -Moleküle. Es ist ferner anzunehmen, daß sich in der Latenzzeit zwischen den Meßserien I–IV auch die Stabilität des einen Teiles der erhalten gebliebenen H_2O_2 -Moleküle vermindert, weshalb sich zu Beginn der II., III. und IV. Meßserie bei dem Verschließen des Meßgefäßzapfens und zu Beginn der mit Kugeln vorgenommenen Rührung die Substratmoleküle leichter als im weiteren Verlauf abbauen.

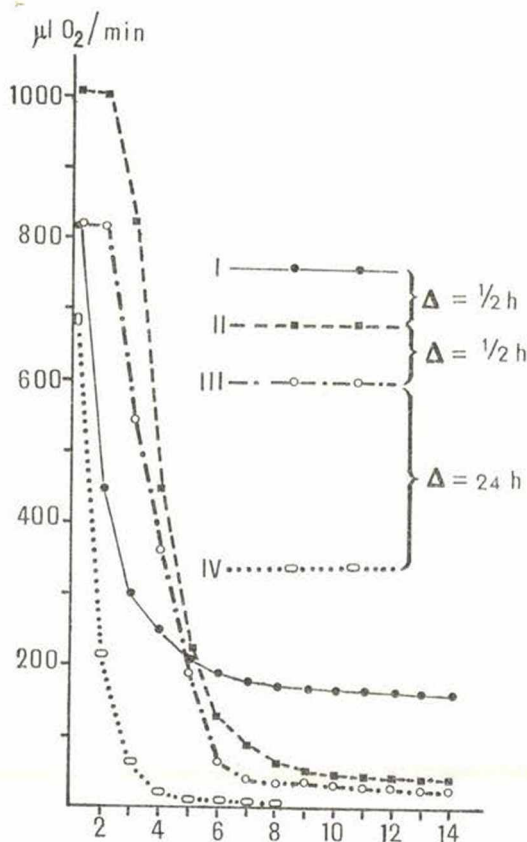


Abb. 2. Verminderung der Katalaseaktivität der Hefesuspension nach der an der waagrechten Achse angegebenen Meßreihenfolge. Reaktivierung derselben Probe nach halb und 24stündiger „Relaxationspause“ (Δ) in den neueren Meßserien (I–IV).

All diese Vermutungen stören die auch im Titel der Abhandlung stehende ursprüngliche Richtung der Untersuchung nicht. Es kann nämlich festgestellt werden, daß die Hefezellen in einer 1%igen H_2O_2 -Lösung selbst nach 24 Stunden nicht ihre Katalaseaktivität verlieren, zeitweise

läßt sich sogar die Erneuerung der Aktivität wahrnehmen. So beträgt z.B. am Ende der I. Meßserie die Menge des durch die Katalaseaktivität freigesetzten Gases $164 \mu\text{l O}_2/\text{min}$. Nach einer halbstündigen Pause nimmt die Aktivität in beträchtlichem Maße zu; deshalb beträgt zu Beginn der II. Meßserie die Leistung $1005 \mu\text{l O}_2/\text{min}$. Eine ähnliche „Relaxation“ auch zu Beginn der III. und IV. Meßserie wahrzunehmen.

Möglicherweise kommen auch die im Substrat vor sich gehenden Änderungen in den Zahlangaben zur Geltung, jedoch können sie die Tatsache nicht verschleiern, daß sich auch die Katalaseaktivität der Zellen erneuert. Vorläufig ist uns nicht bekannt, ob diese Erneuerung an denselben Enzymmolekülen vor sich geht oder ob aus dem Inneren der Zellen stets neuere Enzymmoleküle an die Oberfläche kommen. Unsererseits halten wir die letztere Hypothese für wahrscheinlich, wobei sich die sog. molekulare Aktivität (Straub 1965) gewiß vermindert.

Zusammenfassung

Es wurde ein Gerät konstruiert, mit welchem sich die Katalaseaktivität ein und derselben Hefesuspension aufeinanderfolgend öfters messen läßt. Im Laufe je einer Meßserie hat sich die Katalaseaktivität in raschem Gange vermindert, doch ließen wir zumindest eine halbe Stunde lang das System unberührt in der Weise, daß wir mit dem Rühren der Suspension pausierten und so die einzelnen Zellen durch die Gashülle von dem H_2O_2 -Substrat bis zu einem gewissen Grade abgetrennt worden sind, worauf die Katalaseaktivität von neuem angestiegen ist. Es ist anzunehmen, daß während der Zeit der „Relaxation“ neuere Enzymmoleküle die Funktion der inaktivierten Moleküle übernommen haben.

SCHRIFTTUM

- Frenyó V. — Herczegh T. — Pádi Gy. 1970. Katalázvizsgálatok élelmiszerek szemvizettségének kimutatására. (Katalaseuntersuchungen zum Nachweis der Verunreinigung von Lebensmitteln). Vortrag und Vorführung auf der Fachtagung der Station des Gesundheits- und Seuchenbekämpfungsdienstes am 21. Mai.
- Frenyó V. — Pádi Gy. 1971. Élesztősejtek katalázértékének dinamikája (Dynamik des Katalasewertes der Hefezellen). Botanikai Közlemények 58:203-207.
- Mihályfi J. P. 1965. A kataláz, mint élettani mutató (Die Katalase als physiologischer Anzeiger). Doktorarbeit, Budapest.
- Sábel, L. — Jakab, M. — Selli, G. 1963. Az élesztő enzimaktivitása vizsgálatainak módszerei (Untersuchungsmethoden der Enzymaktivität der Hefe). Kísérlet. Orvostud. 15: 265.
- Straub F. B. 1965. Biokémia (Biochemie). Medicina Könyvkiadó Budapest. 488 p.